

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :

2 798 604

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national :

99 11652

(51) Int Cl⁷ : B 01 J 19/00, B 01 L 7/00, C 12 N 15/10, C 12 Q 1/68

(12)

BREVET D'INVENTION

B1

(54) DISPOSITIF POUR LA REALISATION DE REACTIONS CHIMIQUES OU BIOCHIMIQUES PAR CYCLAGE THERMIQUE.

(22) Date de dépôt : 17.09.99.

(30) Priorité :

(43) Date de mise à la disposition du public
de la demande : 23.03.01 Bulletin 01/12

(45) Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 07.12.01 Bulletin 01/49.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : GENSET Société anonyme et
COMMISSARIAT À L'ENERGIE ATOMIQUE — FR.

(72) Inventeur(s) : FOUILLET YVES, VAUCHIER
CLAUDE, CLERC JEAN-FRÉDÉRIC et PEPONNET
CHRISTINE.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : REGIMBEAU.

FR 2 798 604 - B1

La présente invention se rapporte au domaine de l'analyse biologique et chimique. Elle s'applique à tout protocole biologique ou chimique incluant une étape par cyclage thermique. Elle se rapporte entre autres à la 5 réaction de polymérisation en chaîne (ou PCR), largement utilisée en analyse génétique. L'invention qui est utilisable en analyse génétique est cependant également utilisable pour de nombreux protocoles chimiques non génétiques.

10 On fera d'abord de brefs rappels sur les propriétés physico-chimiques de l'ADN puis nous présenterons un élément d'art antérieur concernant un dispositif pour réaliser la PCR.

15 L'ADN est une macromolécule composée d'un enchaînement de quatre nucléotides différents (A, C, G, T). Les quatre nucléotides sont capables de s'apparier deux à deux (A:T et G:C). On parle de complémentarité. Deux brins complémentaires sont capables de s'hybrider et de se séparer successivement à l'infini. L'état 20 double ou simple brin dépend des conditions de stringeance (ou de température). C'est cette capacité d'hybridation et de dénaturation successives qui est utilisée au cours de la réaction de PCR (réaction de polymérisation en chaîne).

25 Comment dès lors s'effectue la synthèse d'ADN ? Dans la nature, lors de la division cellulaire, l'ADN est dupliqué de façon à assurer la transmission de l'information génétique. La synthèse de cet ADN est assurée par des enzymes. Il s'agit des ADN polymérases.

30 A partir d'un brin d'ADN matrice, elles incorporent en face de chaque nucléotide celui qui lui est complémentaire, créant ainsi un nouveau brin d'ADN. C'est l'elongation.

In vitro, pour réaliser cette synthèse, il faut fournir à la polymérase en plus de la matrice et des dNTP, une amorce qui permettra d'initier la polymérisation. Cette amorce est un court fragment d'ADN 5 (une vingtaine de nucléotides environ) complémentaire d'une extrémité du fragment d'ADN matrice. Pour obtenir de l'ADN double brin, il faut deux amores : une sur chaque brin, de part et d'autre du fragment que l'on veut amplifier.

10 En vue de reproduire un ADN en de multiples exemplaires, la PCR exploite les capacités de dénaturation et d'hybridation de l'ADN ainsi que l'élongation par une polymérase. Le principe est le suivant :

15 - dénaturation de l'ADN par chauffage de la solution à 94°C, de façon à séparer complètement les deux brins d'ADN et à éliminer les structures secondaires ;
- hybridation de l'amorce sur le simple brin en abaissant la température afin de permettre l'appariement spécifique ; et
20 - élongation d'un brin d'ADN en se plaçant à la température optimale d'activité de la polymérase thermostable, soit 72°C.

Après ces trois étapes qui constituent un cycle, on 25 dénature à nouveau : l'ADN néosynthétisé va servir à son tour de matrice. Les cycles sont ainsi répétés vingt à trente fois. L'augmentation de la quantité de matrice est exponentielle.

Il existe, en analyse génétique, d'autres 30 protocoles nécessitant des cyclages en température : ainsi on connaît des techniques d'amplification dérivées de la PCR (Polymerase Chain Reaction) telles que la RT-PCR, la PCR allèle spécifique, et la Taq Man PCR (White B.A., 1997). On connaît également des techniques de LCR.

(Ligase Chain Reaction) comme la LCR, la Gap LCR, Asymmetric Gap LCR, la RT-LCR, l'Oligonucleotide Ligation Assay (OLA), et la PCR-OLA (Bouma, S.R., 1993), (Segev, D., 1990), (Nikiforov, T., 1995), (Marshall, R.L., 5 1994), Nickerson, D.A. et al., 1990). On connaît des réactions de séquençage cyclique à partir de clones ou de réactions de PCR. On connaît des réactions de microséquençage cyclique (single nucleotide primer extension) (Cohen, D., 1996).

10 Toutes ces techniques sont concernées par l'invention dans la mesure où elles impliquent un cyclage en température.

On connaît du document US-5 736 314 un dispositif permettant de mettre en œuvre la PCR. La solution parcourt un tube entouré d'éléments chauffants annulaires. Chaque élément chauffe à une température donnée le morceau de tube qu'il entoure. À mesure qu'elle parcourt le tube, la solution est donc soumise à différentes températures successives qui convenablement choisies permettent de mettre en œuvre la PCR. Ce dispositif a pour inconvénient qu'il requiert d'avoir autant de zones thermiques qu'il y a de températures différentes dans un cycle et qu'il y a de cycles. Cela rend le circuit de la solution particulièrement long. De 15 plus, chaque zone thermique doit être isolée le mieux possible des zones adjacentes pour garantir autant que possible une température uniforme dans chaque zone. Or, cela est difficile à réaliser en pratique et/ou très coûteux. De plus, cela allonge également le circuit.

30 Un but de l'invention est de fournir un dispositif de cyclage thermique permettant de réduire la longueur du circuit de la solution et d'obtenir à faible coût les températures exactement requises pour le cyclage thermique.

En vue de la réalisation de ce but, on prévoit selon l'invention un dispositif pour la réalisation de réactions chimiques ou biochimiques par cyclage thermique, comportant au moins un canal, des moyens pour 5 alimenter en continu le canal avec une solution et des moyens pour donner au canal au moins deux températures prédéterminées de sorte que la solution est mise à ces températures lorsqu'elle parcourt une fois le canal, le dispositif comportant des moyens pour faire passer le 10 canal de l'une à l'autre des températures au cours du temps durant le parcours du canal par la solution.

Ainsi, toute la solution circulant dans le canal (ou dans le tronçon du canal considéré) est portée successivement aux différentes températures requises par 15 le cyclage thermique. En choisissant la vitesse de parcours, on détermine donc le nombre de fois où la solution subit ce cyclage dans le canal. Le nombre de cycles sera d'autant plus élevé que la vitesse de parcours de la solution sera basse.

20 L'invention permet de réduire les dimensions du dispositif, ce qui réduit le coût de réalisation.

L'utilisation d'une seule zone thermique pour le canal supprime les difficultés apparaissant dans l'art antérieur avec les zones thermiques voisines à 25 températures différentes. L'invention permet de donner au canal une configuration linéaire, ce qui est facile, et donc peu coûteux, à fabriquer. Il est très avantageux de supprimer les virages et de diminuer la longueur des canaux notamment quand le fluide circule par effet 30 électro-osmotique. L'invention limite les risques de contamination entre différents protocoles successifs et facilite les rinçages et les nettoyages. Les temps des différentes étapes des cycles peuvent être facilement modifiés sans changer ni la microstructure, ni le mode

de thermostatisation, mais uniquement le débit du fluide à traiter. Des débits très lents peuvent être utilisés puisque la longueur du circuit peut être petite. Ceci apporte beaucoup d'avantages, notamment lorsque le 5 liquide est déplacé par pression car les pertes de charge sont beaucoup plus petites. L'invention permet de traiter rapidement une grande quantité de solution puisque le cyclage thermique a lieu à flux continu de liquide. Elle permet d'assurer un haut débit de liquide.

10 L'invention permet de mettre en œuvre de nombreuses techniques bien connues de l'homme du métier. On peut citer notamment :

- tous les types de PCR comme la PGR, la RT-PCR, la PCR allèle spécifique, la Taqman PCR ;
- tous les types de LCR (Loop Chain Reaction) comme la LCR, la Gap LCR, l'Asymmetric Gap LCR, la RT-LCR, l'Oligonucleotide Ligation Assay (OLA), et la PCR-OLA ;
- les réactions de séquençage cyclique à partir de clones ou de réactions de PCR ;
- 20 - les réactions de microséquençage cyclique (single nucleotide primer extension) ; et
- toute autre opération biologique nécessitant des cyclages thermiques.

L'invention pourra présenter en outre au moins 25 l'une des caractéristiques suivantes :

- le dispositif est agencé de sorte que la solution est mise aux températures suivant une succession temporelle formant un cycle prédéterminé et de sorte que la solution subit au moins deux fois le cycle lorsqu'elle 30 parcourt une fois le canal ;
- le dispositif est agencé de sorte que la solution est mise à au moins trois températures différentes lorsqu'elle parcourt une fois le canal ;

- le dispositif comporte au moins deux canaux en communication mutuelle et des moyens pour donner à chaque canal au moins deux températures respectives prédéterminées et pour faire passer chaque canal au cours du temps de l'une à l'autre des températures associées de sorte que la solution est mise aux températures lorsqu'elle parcourt une fois chaque canal;
- le canal étant un premier canal et les moyens de modification de la température étant aptes à la modifier durant une période prédéterminée, le dispositif comporte au moins un canal à température constante durant la période prédéterminée et communiquant avec le premier canal;
- le dispositif comporte plusieurs canaux disposés en parallèle les uns aux autres, les canaux ayant des températures identiques entre eux à un instant quelconque donné;
- le dispositif comporte une plaque dans laquelle est ménagé le ou chaque canal; et
- la plaque est en silicium.

On prévoit également selon l'invention un procédé de réalisation de réactions chimiques ou biochimiques par cyclage thermique, dans lequel on alimente en continu au moins un canal avec une solution et on donne à la solution au moins deux températures prédéterminées de sorte que la solution est mise aux températures lorsqu'elle parcourt une fois le canal, dans lequel on fait passer le canal de l'une à l'autre des températures au cours du temps durant le parcours du canal par la solution.

Le procédé pourra présenter en outre au moins l'une des caractéristiques suivantes :

- la réaction concerne les acides nucléiques naturels, synthétiques ou modifiés, purifiés ou extraits d'échantillon, sous la forme ADN, ARN, ou fragments d'ADN ou d'ARN ;
- 5 - la réaction concerne des nucléotides naturels ou modifiés ;
- la réaction comprend une synthèse d'acides nucléiques, notamment d'ADN ou de fragment d'ADN comprenant éventuellement des nucléotides possédant des 10 modifications chimiques ;
- la réaction comprend une réaction de polymérisation en chaîne.

Comme évoqué ci-dessus, on entend par « réaction de polymérisation en chaîne » dans le cadre de l'invention toute technique PCR, dérivant ou équivalente à la PCR. Ces techniques comprennent l'amplification spécifique et/ou non spécifique d'acides nucléiques sous la forme ADN, ARN naturel ou modifié (PNA). Ainsi, le dispositif et/ou le procédé selon l'invention peut-être utilisé 20 pour effectuer l'amplification d'une seule séquence ou de plusieurs séquences simultanément. À cet titre, les PCR en « multiplex » ont été décrites dans Apostolakos (1993) Anal. Biochem., 213, 277-284 et Edwards (1994) PCR Methods Applied, 3, 65-75. Dans une même réaction, 25 on amplifie plusieurs séquences simultanément en utilisant plusieurs couples d'amorces.

D'autres techniques, dérivées de la PCR, peuvent également être mises en œuvre avec le dispositif ou le procédé selon l'invention :

- 30 - la LCR (Ligase Chain Reaction), basée sur l'utilisation d'une ADN ligase thermostable ; Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 189-193 et la Gap-LCR est dérivée de la LCR ;

- l'ERA (End Run Amplification), et la GERA (Gap-ERA) ; Adams (1994) Novel amplification technologies, for DNA/RNA-based diagnostics meeting, San Francisco, CA, USA ;

5 - la CPR (Cycling Probe Reaction), qui met en œuvre un chimère ADN-ARN-ADN et la ribonucléase H ; Duck (1990) BioTechniques, 9, 142-147 ;

- la SDA (Strand Displacement Amplification) ; Walker (1992) Nucleic Acids Res., 20, 1691-1696 ;

10 - la TAS (Transcription-based Amplification), Kwoh (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1173-1177, utilise la Reverse Transcriptase et la T7 polymerase. La Self Sustained Sequence Replication s'apparente à la TAS ; Gingeras (1990) Ann. Biol. Clin., 48, 498-501

15 - la NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) est assez similaire à la 3SR ; Kievits (1991) J. Virol. Methods, 35, 273-286 ;

- les techniques permettant l'amplification non spécifique de toutes les séquences nucléotidiques d'un échantillon ; Lüdecke (1989) Nature, 338, 348-350, Kinzler (1989) Nucleic Acids Res., 17, 3645-3653 ; Zhang (1992) Proc. Natl. Acad. USA, 89, 5847-5851, et Grothues (1993) Nucleic Acids Res., 21, 1321-1322 ; et US-5,731,171 ; et

20 - l'amplification des ARNm totaux de cellules qui a été décrit notamment de la page 120 à 121 de « La PCR, un procédé de réplication *in vitro* » Daniel Larzul, Collection Génie Génétique Ed. Lavoisier. L'homme du métier trouvera d'ailleurs dans cette dernière

25 référence, d'autres exemples de techniques d'amplification pouvant être mises en œuvre dans le cadre de l'invention.

L'invention concerne également l'utilisation du dispositif et du procédé selon l'invention :

- pour effectuer une réaction de synthèse et/ou d'amplification d'un ou de plusieurs acides nucléiques ;
- pour mettre en œuvre les techniques PCR, PCR multiplex, LCR, ERA, CPR, SDA, TAS, NASBA, les 5 techniques d'amplification spécifiques ou non spécifiques, et l'amplification des ARNm totaux ; et
- pour le séquençage enzymatique d'un acide nucléique.

Le dispositif et le procédé selon l'invention peuvent donc également être utilisés pour le séquençage enzymatique d'un acide nucléique. La technique consiste à ajouter seulement une quantité limitante des nucléotides XTP dans le mélange réactionnel, ledit mélange comprenant une quantité de nucléotides marqués permettant la détection des produits. On peut également utiliser dans le mélange réactionnel une faible quantité d'un nucléotide terminateur (ddXTP). Ces méthodes et leurs perfectionnements sont bien connus de l'homme du métier et sont notamment décrites pages 27 à 37 et 58 à 72 dans Maillet E, Baron L. et Soussi T. "Séquençage des 20 acides nucléiques, Collection Génie Génétique, Mc et Doc LAVOISIER Editions Médicales Internationales".

On prévoit en outre selon l'invention un produit ayant subi une réaction chimique ou biochimique réalisée selon un procédé conforme à l'invention.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront encore dans la description suivante de cinq modes préférés de réalisation donnés à titre d'exemples non limitatifs. Aux dessins annexés :

- les figures 1 à 5 sont des vues schématiques de dispositifs selon cinq modes de réalisation respectivement ;
- la figure 6 est une vue en plan d'un substrat utilisable pour ces cinq modes ; et

- les figures 7 et 8 sont des vues transversales en coupe selon les plans respectifs VII-VII et VIII-VIII de la figure 6.

On va décrire dans leurs principes en référence aux 5 figures 1 à 5 cinq modes de réalisation du dispositif de l'invention appliqués ici à la mise en œuvre d'un protocole de PCR par cyclage thermique.

Dans le premier mode de réalisation illustré à la figure 1, le dispositif 101 comporte une unité de 10 cyclage thermique 102 comprenant un substrat 103. Le substrat sera décrit plus bas en plus grands détails en référence aux figures 6 à 8. Le substrat 103 présente un canal 104 en communication de fluide par son extrémité amont avec un conduit d'alimentation amont 106 et par son extrémité aval avec un conduit de sortie aval 108.

Le dispositif 101 comprend des moyens 105 pour faire parcourir en continu le canal 104 par une solution amenée par le conduit 106 et sortant par le conduit 108, la solution parcourant ainsi une seule fois le canal 104 suivant sa longueur durant tout tel protocole. La solution contient les réactifs nécessaires pour la réalisation de la PCR.

L'unité 102 comprend des moyens pour chauffer ou refroidir à volonté le substrat 103, ces moyens étant 25 classiques et connus en soi. Dans la suite et pour la simplicité, ces moyens seront appelés moyens de chauffage étant entendu qu'ils servent au chauffage et au refroidissement et ainsi permettent d'élever ou d'abaisser la température du substrat et du canal. Les 30 moyens de chauffage sont agencés pour chauffer ou refroidir le substrat 103 dans son intégralité de sorte que quelle que soit la température qu'ils confèrent à un instant donné au canal 104, tous les tronçons du canal 104 ont même température entre eux.

L'unité 102 comprend des moyens pour commander les moyens de chauffage afin qu'ils donnent au canal 104 différentes températures successivement au cours du temps. Ces températures sont ici au nombre de trois et 5 sont celles, connues, utilisées lors de la PCR. Ainsi, le canal 104 est d'abord placé à une température T_1 , puis refroidi à une température T_2 , puis réchauffé à une température intermédiaire T_3 . Cette succession temporelle forme un cycle de température. Ce cycle est 10 répété de nombreuses fois au cours du temps, comme l'illustre le graphe de la figure 1. Ainsi, après une période à la température T_3 , le canal 104 est à nouveau placé à la température T_1 , pour le début d'un nouveau cycle et ainsi de suite.

15 Ce cyclage est effectué alors que la solution parcourt le canal depuis le conduit d'alimentation 106 jusqu'au conduit de sortie 108. On choisit ici la section du canal 104 où la vitesse de la solution de sorte à ce que la solution portée aux différentes 20 températures T_1 , T_2 et T_3 entre son entrée et sa sortie du canal subit le cycle vingt ou trente fois par exemple. Par conséquent, les réactions de PCR se succèdent les unes aux autres. Les différents tronçons 25 du canal qui d'amont en aval ont à un instant donné la même température, se différencient seulement par le fait qu'ils sont traversés par des fractions de solution respectives qui ont déjà subi un nombre de cyclages thermiques différent et d'autant plus élevé que ces fractions de solution s'approchent du conduit de sortie.

30 Le deuxième mode de réalisation, illustré à la figure 2 avec des références augmentées de 100, se différencie du précédent seulement par le fait que plusieurs canaux 204 s'étendant en parallèle sont ménagés dans le substrat 103. Il se passe dans chaque

canal 204 de ce mode ce qui se passait dans le canal 104 du premier mode. Notamment, les moyens de chauffage effectuent le même cyclage thermique sur tout le substrat. Dans ce deuxième mode, à un instant 5 quelconque, tous les tronçons de tous les canaux 204 ont même température entre eux. Les canaux 204 ont ici chacun leurs conduits d'alimentation et de sortie en propre. On peut ainsi traiter en même temps des solutions différentes. Alternativement, les canaux 204 10 pourraient être associés à des conduites d'alimentation et de sortie communs, par exemple si la même solution parcourt les différents canaux.

Dans le troisième mode de réalisation illustré à la figure 3, et pour lequel les références des éléments analogues sont augmentées de 200, le dispositif comporte à nouveau plusieurs canaux. De plus, il comporte cette fois non plus une seule unité de cyclage thermique 302 (à substrat/moyens de chauffage et moyens de commande), mais plusieurs unités 302a, 302b de ce type, par exemple 20 au nombre de deux. Les deux unités 302a, 302b sont disposées en série de sorte que les canaux 304a, 304b de l'unité amont 302a communiquent par leur extrémité aval et via des conduits de transfert respectifs 309 avec les extrémités amont des canaux 304b de l'unité aval 302b. 25 Chaque ensemble de canaux en communication mutuelle forme un circuit.

L'unité amont 302a est en soi identique à celle du deuxième mode et soumet la solution au cyclage thermique déjà décrit associé aux températures T1, T2 et T3. 30 L'unité aval 303b effectue en l'espèce un cyclage thermique dont les paramètres sont différents de ceux du cyclage de l'unité amont. Ainsi, ce cyclage aval est associé à trois températures T4, T5 et T6, différentes des températures T1, T2 et T3. De plus, la durée et la

succession des températures, illustrées au graphe le plus bas sur la figure 3, sont différentes de celles du premier cyclage. Par conséquent, la solution parcourant chaque circuit subit d'abord plusieurs fois le cyclage de l'unité amont 302a à mesure qu'elle parcourt cette unité, puis traverse le conduit de transfert 309 et arrive sur l'unité aval 302b où elle subit le cyclage propre à cette unité, et ce plusieurs fois pourvu que la vitesse de la solution dans cette unité soit suffisamment lente. La solution sort enfin du dispositif 301 par le conduit de sortie 308.

Dans le dispositif selon le quatrième mode de réalisation illustré à la figure 4, les références numériques des éléments analogues ont été augmentées de 300. Le dispositif 401 comporte une unité de cyclage thermique 402 semblable à celle du deuxième mode. Il comporte en outre deux unités 410a et 410b comprenant chacune un dispositif 403 et des moyens pour assurer aux canaux 412 traversant ces unités une température, respectivement T_7 et T_8 , temporellement constante. Les trois unités 410a, 402 et 410b sont disposées en série et dans cet ordre avec leurs canaux respectifs en communication d'amont en aval. Ainsi, la solution introduite dans un conduit d'alimentation 406 parcourt un canal 412 de l'unité amont 410a où elle est placée à la température T_7 constante pendant une période préterminée, notamment supérieure à la durée d'un cycle de l'unité 402. Elle franchit ensuite le conduit de transfert 409 puis arrive dans l'unité de cyclage thermique 402 où elle subit le cycle thermique plusieurs fois. Puis, passant dans le deuxième conduit de transfert 409, elle débouche dans l'unité aval 410b à température constante T_5 où elle demeure à cette température pendant une autre période préterminée.

Elle est ensuite évacuée du dispositif par le conduit de sortie 408.

En référence à la figure 5, dans laquelle les éléments analogues portent des références augmentées de 5 400, on a illustré un cinquième mode de réalisation dans lequel un conduit secondaire 514 débouche dans le conduit d'alimentation 506.

Ainsi, on forme la solution à traiter, par exemple par un mélange de réactifs, juste avant l'arrivée sur 10 l'unité de cyclage thermique qui est identique à celle du deuxième mode 502. On forme ainsi un mélangeur amont. Alternativement ou cumulativement, on peut prévoir un séparateur aval en mettant le conduit de sortie en communication latérale avec un conduit de dérivation.

Naturellement, on pourra combiner ces différents modes de réalisation entre eux, par exemple en ajoutant au moins une unité à température fixe au dispositif de la figure 3. (fig.)

Il importe de noter que ces différents modes de réalisation mettent en œuvre les protocoles avec une solution à flux continu ininterrompu.

On a détaillé aux figures 6 à 8 une unité 2) de cyclage thermique à plusieurs canaux 4 utilisable dans les modes de réalisation présentés. Le substrat 3 comprend ici une plaque 16 en silicium, mais cette plaque pourrait être réalisée dans un autre matériau, par exemple en verre, en quartz, en matériau polymère ou en matière plastique. Des canaux 4 sont réalisés par gravure chimique de microrainures (de façon connue en soi) dans une face supérieure de la plaque. Chaque canal 4 est rectiligne et a un profil en triangle isocèle (ou en « V ») dont un côté s'étend dans le plan de la face de la plaque. Une rampe inclinée relie le fond du canal à la face de la plaque à chaque extrémité du canal. A ce

stade, chaque canal 4 est ouvert en partie supérieure de la plaque. Le substrat 3 comprend une deuxième plaque 18 présentant des orifices 20 aptes à venir en coïncidence avec les extrémités des canaux. Cette plaque s'étend sur 5 la plaque 16. Elle obture ainsi la face supérieure des canaux et donne accès à ceux-ci.

La solution circule dans l'un des orifices, puis dans le canal 4 associé, puis dans l'autre orifice. La deuxième plaque 18 peut être réalisée dans le même type 10 de matériaux que la première 16. Les deux plaques sont scellées ou collées l'une sur l'autre par exemple.

Un avantage du silicium est que le silicium est un bon conducteur thermique, ce qui donne des temps de réponse en température très courts. De plus, les 15 microtechnologies sur silicium sont largement connues et il est facile de contrôler parfaitement les dimensions des canaux. Un exemple de dimensions des canaux est :
- largeur des canaux : 100 µm (de quelques microns à quelques centaines de microns est aussi envisageable) ;
20 - longueur des canaux : jusqu'à plusieurs centimètres.

Les moyens de chauffage 20 sont placés sous la plaque 16 contre sa face inférieure opposée à celle supérieure portant les canaux. Ils assurent le chauffage et le refroidissement de la plaque de façon connue en 25 soi, par exemple par effet Pelletier, effet Joule, rayonnement ou convection.

Notons aussi qu'il est possible d'intégrer les moyens de chauffage 20 directement sur le silicium, par exemple en usinant des résistances chauffantes à la 30 surface d'une des deux plaques 16, 18, et en plaçant l'ensemble sur une source froide pour évacuer la chaleur.

Durant le passage de la solution sur l'unité 2, le nombre de cyclages est fonction du temps passé par la solution sur l'unité. Il est donc important de bien contrôler le débit de la solution. Ce contrôle pourra 5 être effectué au moyen d'un pousse-seringue ou par pompage (force de pression ou électro-osmose par exemple).

Les différents canaux d'un même dispositif peuvent par exemple servir au parcours de solutions comprenant 10 différents ADN.

Le canal pourra être aussi formé par un tube capillaire, pourvu que le contrôle de la température de la solution demeure possible.

Il va de soi que les températures T1 à T8 seront en 15 général différentes de la température ambiante et que le dispositif comporte dans chaque mode de réalisation des moyens automatisés de commande de la température de l'unité des cyclage thermique pour l'exécution du cyclage.

NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE

REVENDICATIONS

1. Dispositif pour la réalisation de réactions chimiques ou biochimiques par cyclage thermique, comportant au moins un canal (4 ; 104 ; 204 ; 304a, 304b ; 404 ; 504), des moyens (105) pour alimenter en continu le canal avec une solution et des moyens (20) pour donner au canal au moins deux températures prédéterminées (T₁, T₂, T₃ ; T₄, T₅, T₆) de sorte que la solution est mise à ces températures lorsqu'elle parcourt une fois le canal caractérisé en ce qu'il comporte des moyens (2 ; 102 ; 202 ; 302a, 302b ; 402, 502) pour faire passer le canal de l'une à l'autre des températures au cours du temps durant le parcours du canal par la solution.

2. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est agencé de sorte que la solution est mise aux températures (T₁, T₂, T₃ ; T₄, T₅, T₆) suivant une succession temporelle formant un cycle prédéterminé et de sorte que la solution subit au moins deux fois le cycle lorsque elle parcourt une fois le canal (4 ; 104 ; 204 ; 304a, 304b ; 404 ; 504).

3. Dispositif selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il est agencé de sorte que la solution est mise à au moins trois températures différentes (T₁, T₂, T₃ ; T₄, T₅, T₆) lorsqu'elle parcourt une fois le canal.

4. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le dispositif comporte au moins deux canaux (304a, 304b) en communication mutuelle et des moyens (302a, 302b) pour donner à chaque canal au moins deux températures respectives prédéterminées (T₁, T₂, T₃ ; T₄, T₅, T₆) et

pour faire passer chaque canal au cours du temps de l'une à l'autre des températures associées de sorte que la solution est mise aux températures lorsqu'elle parcourt une fois chaque canal.

5. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le canal (404) étant un premier canal et les moyens (402) de modification de la température étant aptes à la modifier durant une période prédéterminée, le dispositif comporte 10 au moins un canal (412) à température constante (T₇, T₈) durant la période prédéterminée et communiquant avec le premier canal.

6. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le dispositif comporte plusieurs canaux (204 ; 304a, 304b ; 404) disposés en parallèle les uns aux autres, les canaux ayant des températures identiques entre eux à un instant quelconque donné.

7. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comporte une plaque (16) dans laquelle est ménagé le ou chaque canal.

8. Dispositif selon la revendication 7, caractérisé en ce que la plaque (16) est en silicium.

9. Procédé de réalisation de réactions chimiques ou biochimiques par cyclage thermique, dans lequel on alimente en continu au moins un canal (4 ; 104 ; 204 ; 304a, 304b ; 404 ; 504) avec une solution et on donne à la solution au moins deux températures prédéterminées (T₁, T₂, T₃ ; T₄, T₅, T₆) de sorte que la solution est mise aux températures lorsqu'elle parcourt une fois le canal, caractérisé en ce qu'on fait passer le canal de l'une à l'autre des températures au cours du temps durant le parcours du canal par la solution.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que la réaction concerne des acides nucléiques.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que lesdits acides nucléiques sont des ADN et/ou 5 des ARN naturels, synthétiques, ou modifiés.

12. Procédé selon la revendication 9 ou 10, caractérisé en ce que la réaction concerne des nucléotides naturels, synthétiques, ou modifiés.

13. Procédé selon l'une quelconque des 10 revendications 9 à 12, caractérisé en ce que la réaction met en œuvre une synthèse d'acides nucléiques.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 13, caractérisé en ce que la réaction comprend une réaction de polymérisation en chaîne.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que la réaction de polymérisation en chaîne consiste notamment en la technique PCR, PCR multiplex, LCR, ERA, CPR, SDA, TAS, NASBA, les techniques d'amplification spécifiques ou non spécifiques, et 20 l'amplification des ARNm totaux.

16. Utilisation du dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 et du procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 15 pour effectuer une réaction de synthèse et/ou d'amplification 25 d'un ou de plusieurs acides nucléiques.

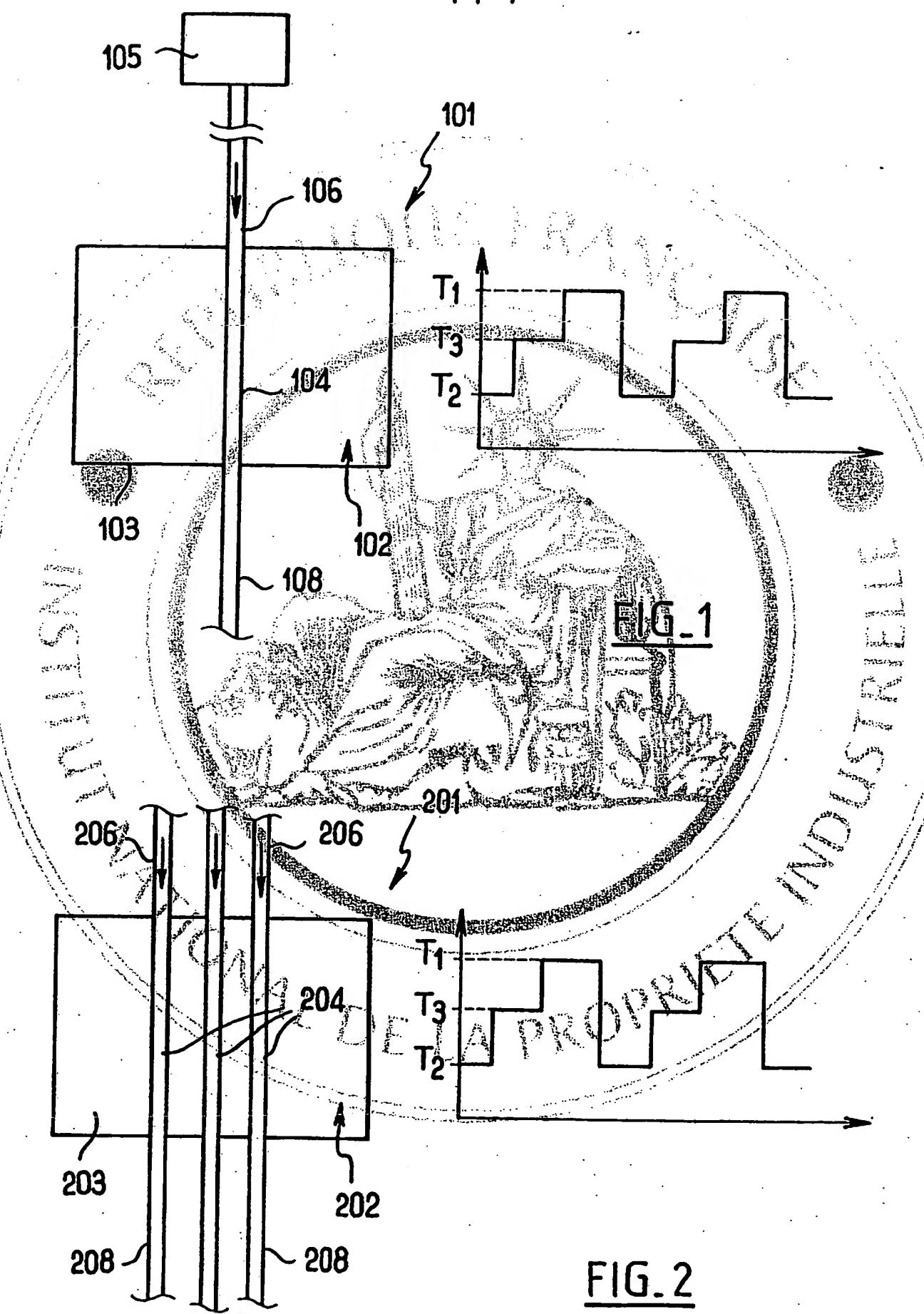
17. Utilisation selon la revendication 16 pour mettre en œuvre les techniques PCR, PCR multiplex, LCR, ERA, CPR, SDA, TAS, NASBA, les techniques d'amplification spécifiques ou non spécifiques, et 30 l'amplification des ARNm totaux.

18. Utilisation du dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 et du procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 13 pour le séquençage enzymatique d'un acide nucléique.

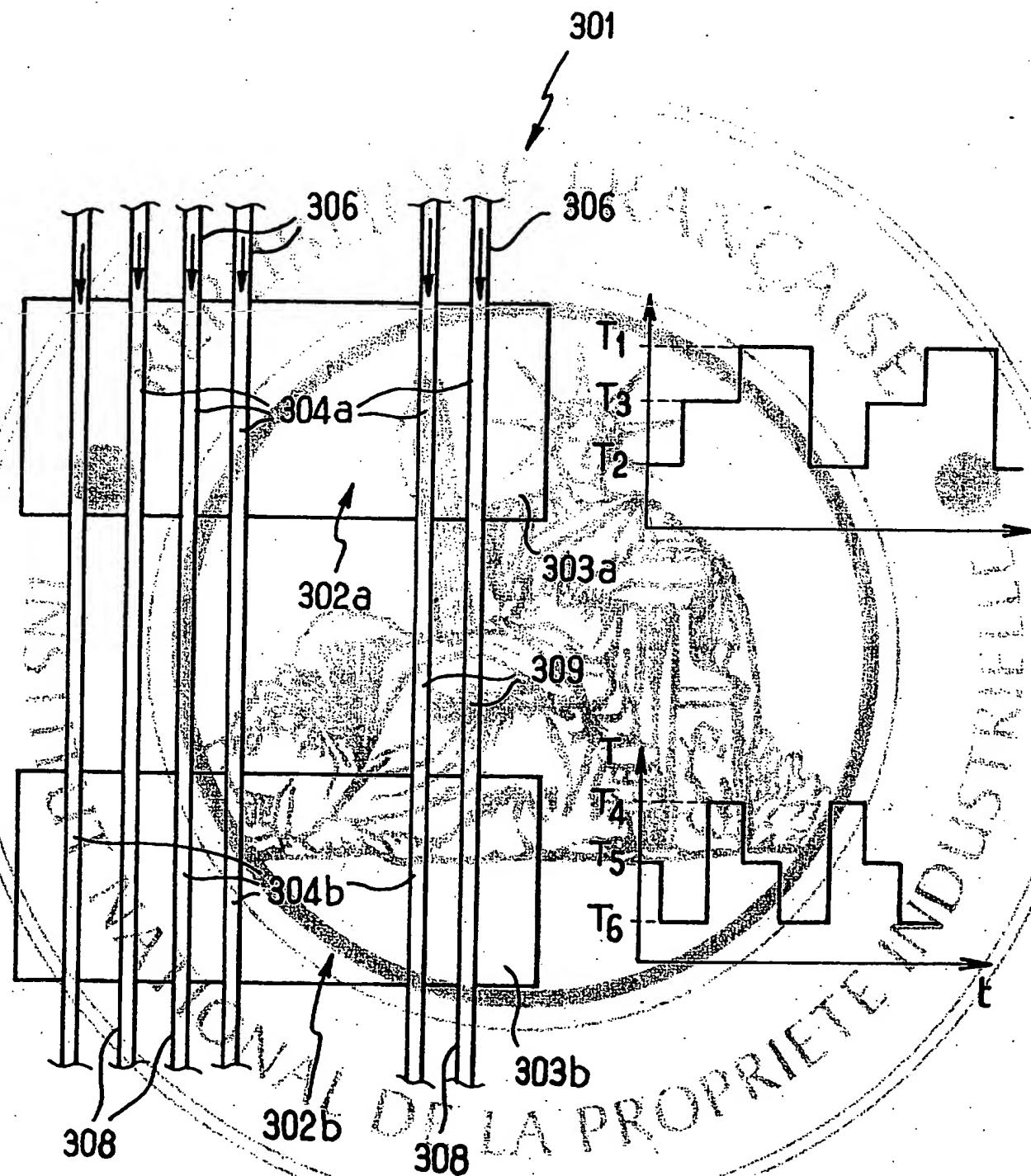
19. Produit, caractérisé en ce qu'il a subi une réaction chimique ou biochimique réalisée selon un procédé conforme à l'une des revendications 9 à 15.



1 / 4

FIG. 2

214



FIG_3

3 / 4

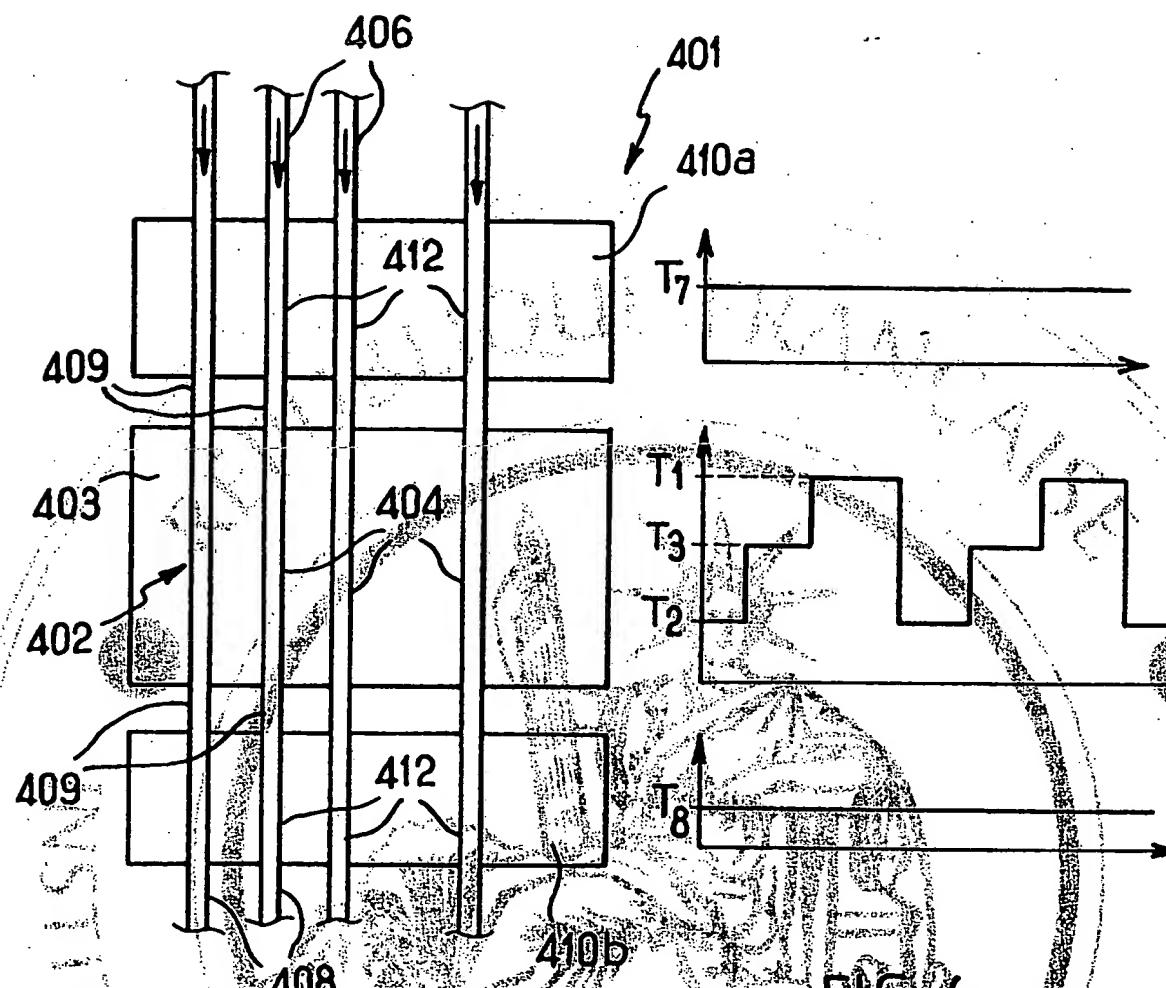
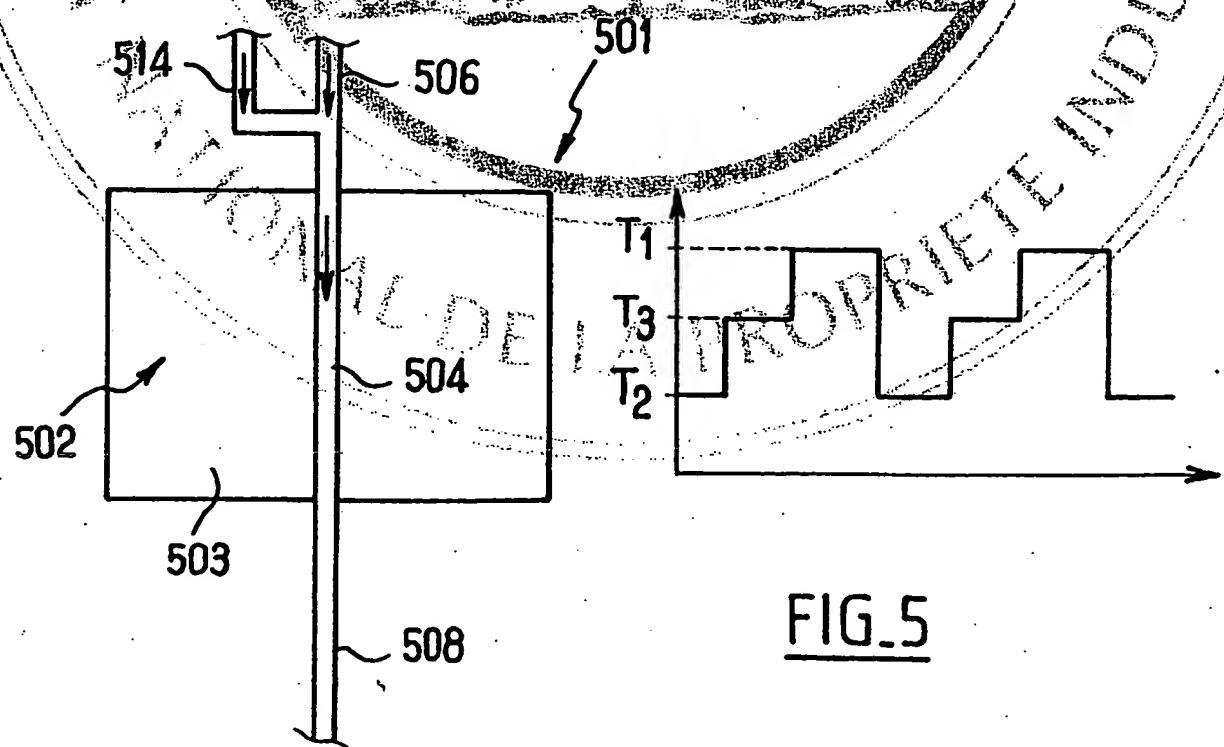


FIG. 4

FIG. 5

COPPER INDUSTRY

4 / 4

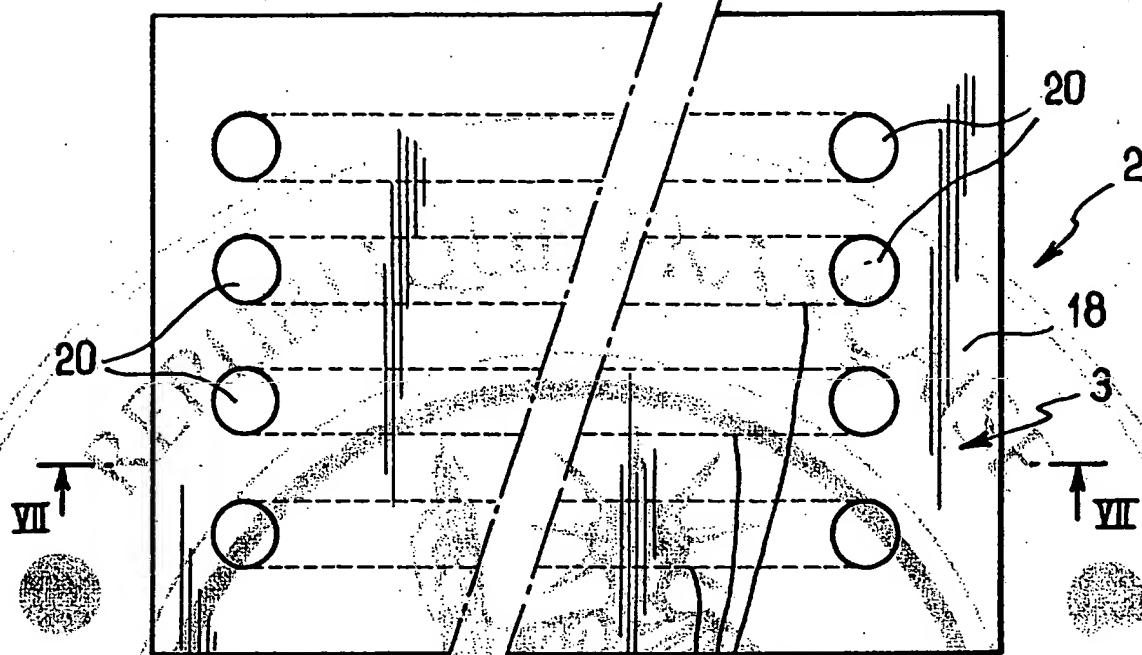


FIG. 6

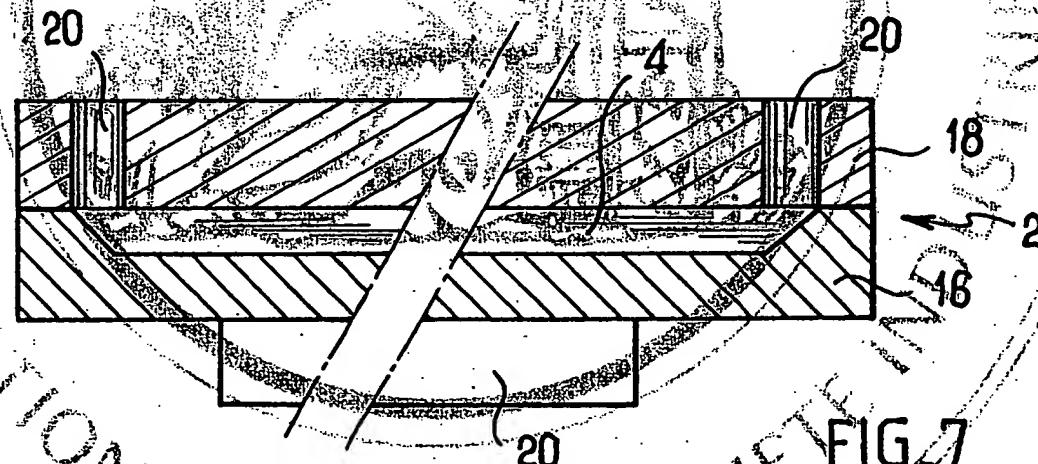


FIG. 7

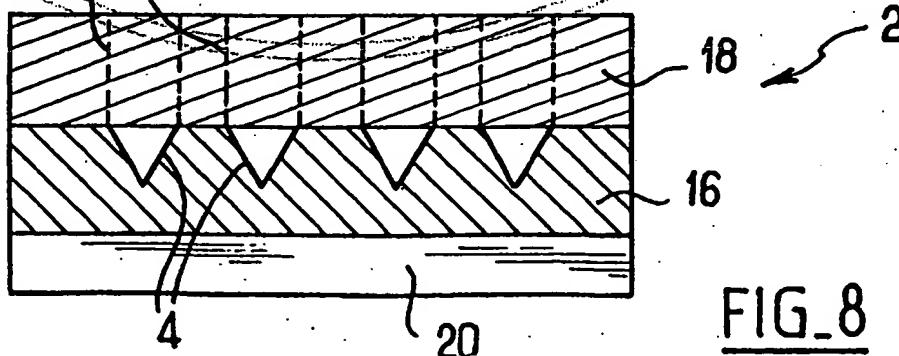


FIG. 8

NATIONAL
INSTITUT
DE LA PROPRIÉTÉ
INTELLECTUELLE

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

Après l'accomplissement de la procédure prévue par les textes rappelés ci-dessus, le brevet est délivré. L'Institut National de la Propriété Industrielle n'est pas habilité, sauf dans le cas d'absence manifeste de nouveauté, à en refuser la délivrance. La validité d'un brevet relève exclusivement de l'appréciation des tribunaux.

L'I.N.P.I. doit toutefois annexer à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention. Ce rapport porte sur les revendications figurant au brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- Le demandeur a maintenu les revendications.
- Le demandeur a modifié les revendications.
- Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec des nouvelles revendications.
- Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

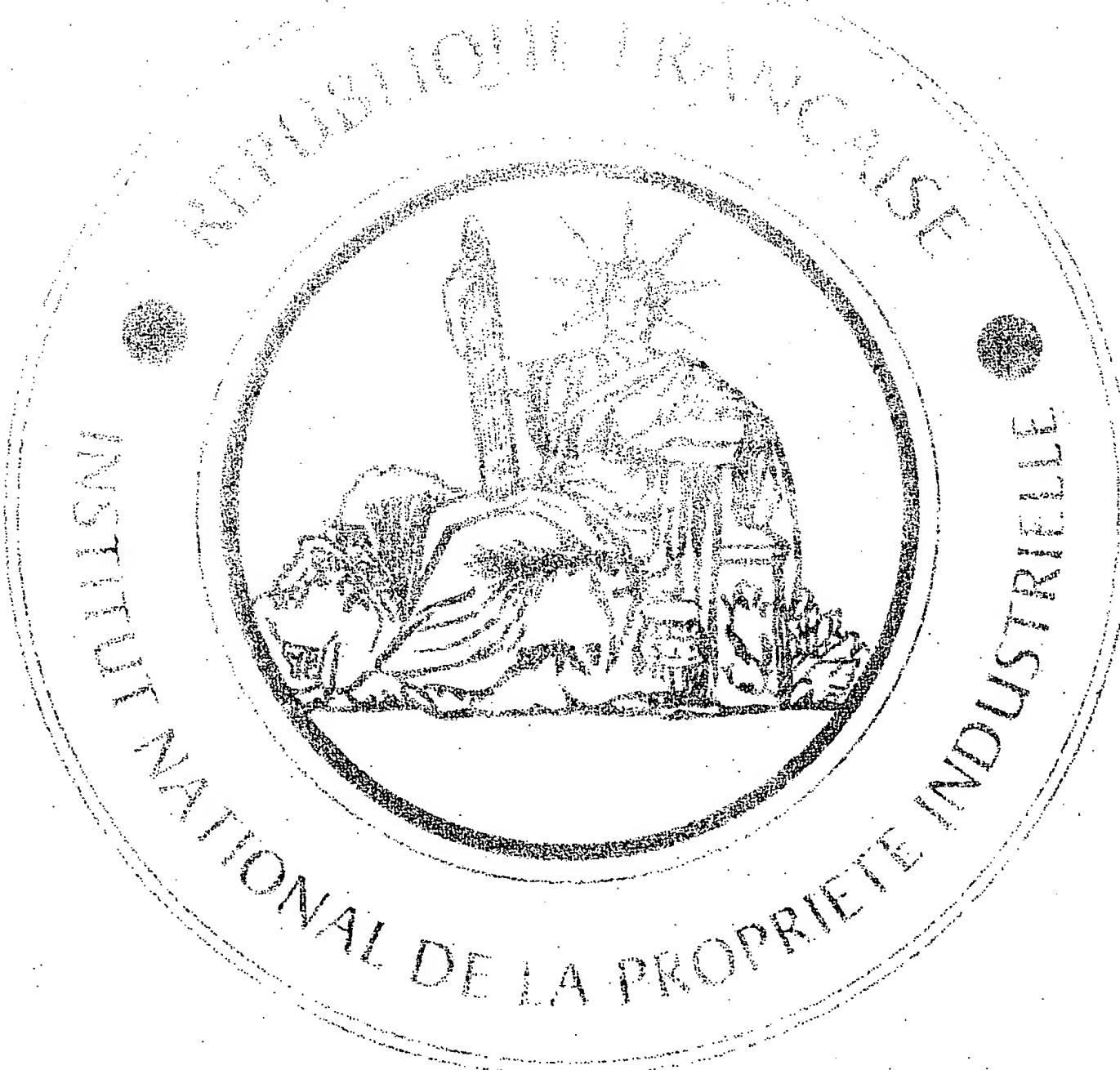
- Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

**1.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN
CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION**

Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Références des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)
<p>WO 99 41015 A (POSER SIEGFRIED ; SCHULZ TORSTEN (DE); INST PHYSIKALISCHE HOCHTECHN) 19 août 1999 (1999-08-19)</p> <ul style="list-style-type: none"> * page 1, ligne 5 - page 1, ligne 29 * * page 3, ligne 26 - page 5, ligne 15 * * page 6, ligne 30 - page 9, ligne 11 * * figure 1. 	1 à 3,5,6,9-12, 14-17,19
<p>WO 99 39005 A (MAYO FOUNDATION - UNIV PITTSBURGH (US)) 5 août 1999 (1999-08-05)</p> <ul style="list-style-type: none"> * page 10, ligne 16 - page 12, ligne 4 * * page 12, ligne 23 - page 10, ligne 12 * * page 13, ligne 28 - page 15, ligne 3 * * page 16, ligne 6 - page 17, ligne 27 * * page 18, ligne 32 - page 19, ligne 14 * * page 19, ligne 31 - page 20, ligne 21 * * page 21, ligne 30 - page 22, ligne 3 * * page 24, ligne 8 - page 24, ligne 27 * * page 29, ligne 13 - page 29, ligne 23 * * page 31, ligne 3 - page 32, ligne 14 * * figures 1,2,5-8 	1 à 4,7 à 19
<p>US 5 866 345 A (WILDING PETER ET AL.)</p> <p>2 février 1999 (1999-02-02)</p> <ul style="list-style-type: none"> * colonne 2, ligne 61 - colonne 3, ligne 30 * * colonne 3, ligne 54 - colonne 3, ligne 65 * * colonne 4, ligne 11 - colonne 4, ligne 20 * * colonne 7, ligne 38 - colonne 7, ligne 46 * * colonne 13, ligne 57 - colonne 15, ligne 47 * * colonne 17, ligne 66 - colonne 18, ligne 9 * * colonne 18, ligne 36 - colonne 19, ligne 58 * * figures 4,5,15,16 	1,5 à 17,19

**2.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRENT
L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL**

Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Références des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)
NEANT	NEANT



ONI

NATIONAL DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE